

⑨日本国特許庁
公開特許公報

⑩特許出願公開
昭53—115814

⑪Int. Cl. ²	識別記号	⑫日本分類	庁内整理番号	⑬公開	昭和53年(1978)10月9日
G 01 N 31/14		30 D 3	6667—44		
C 07 G 7/02 //		113 E 6	6904—49	発明の数	4
G 01 N 33/16		113 A 2	6807—49	審査請求	未請求
		36(2) C 0	7048—49		

(全 11 頁)

⑭免疫学的に活性な物質の測定用試薬

⑯特 願 昭53—29767

⑰出 願 昭53(1978)3月15日

優先権主張 ⑱1977年3月15日 ⑲イギリス国
(GB)⑳10859/77

㉑発 明 者 ダグラス・イー・ホーレイ
オーストラリア国セント・イブ
ス・アーテリアル・ロード44

㉒発 明 者 ビーター・ジー・トシケス
オーストラリア国フェアライ
ト・キング・アベニュー15

㉓出 願 人 エフ・ホフマン・ラ・ロシュ・
ウント・コンパニー・アクチエ
ンゲゼルシャフト
スイス国バーゼル・グレンツア
ヒエルシュトラッセ124—184

㉔代 理 人 弁理士 浅村皓 外3名

明 細 書

1 発明の名称

免疫学的に活性な物質の測定用試薬

2 特許請求の範囲

- (1) 酵素活性の程度もしくは様式を修飾しうる物質で標識された免疫学的に活性な物質又はこの免疫学的に活性な物質と特異的に結合しうる受容体からなる免疫学的に活性な物質の測定用試薬。
- (2) 免疫学的に活性な物質を酵素活性の程度もしくは様式を修飾しうる物質で標識した特許請求の範囲第1項の試薬。
- (3) 免疫学的に活性な物質と特異的に結合しうる受容体を、酵素活性の程度もしくは様式を修飾しうる物質で標識した特許請求の範囲第1項の試薬。
- (4) 受容体が、測定される免疫学的に活性な物質に特異的な抗体である特許請求の範囲第3項の試薬。
- (5) 酵素活性を修飾しうる物質が酵素阻害剤である特許請求の範囲第1ないし5項のいずれか1つの試薬。

(6) 酵素阻害剤が 10^{-5} モル/ℓ 以下の阻害定数を有する特許請求の範囲第5項の試薬。

(7) 酵素阻害剤が 10^{-5} と 10^{-15} モル/ℓ との間の阻害定数を有する特許請求の範囲第6項の試薬。

(8) 阻害剤がメソトレキセートであり、かつ酵素がジヒドロホレート レダクターゼである特許請求の範囲第7項の試薬。

(9) 酵素活性を修飾しうる物質が酵素賦活剤である特許請求の範囲1ないし4項のいずれか1つの試薬。

(10) 免疫学的に活性な物質がジゴキシンである特許請求の範囲第1ないし9項のいずれか1つの試薬。

(11) 免疫学的に活性な物質が人血清アルブミンである特許請求の範囲第1ないし9項のいずれか1つの試薬。

(12) 免疫学的に活性な物質がモルとネである特許請求の範囲第1ないし9項のいずれか1つの試薬。

(13) 免疫学的に活性な物質がフェリテンである特

許請求の範囲第1ないし9項のいずれか1つの試験。

14) 免疫学的に活性な物質又は前記免疫学的に活性な物質と特異的に結合しうる受容体が、酵素活性の程度もしくは様式を修飾しうる物質に共有的に連結する特許請求の範囲第1ないし13項のいずれか1つの試験。

15) ジゴキシンおよびメソトレキサートの抱合体である特許請求の範囲第1項の試験。

16) 人血清アルブミンとメソトレキサートの抱合体である特許請求の範囲第1項の試験。

17) モルヒネとメソトレキサートの抱合体である特許請求の範囲第1項の試験。

18) フェリテンとメソトレキサートの抱合体である特許請求の範囲第1項の試験。

19) 免疫学的に活性な物質又は前記免疫学的に活性な物質と特異的に結合しうる受容体を、カップリング剤の存在下に酵素活性の程度もしくは様式を修飾しうる物質と反応させることからなる特許請求の範囲第1ないし14項のいずれか1つの試験。

24) 酵素活性を修飾しうる物質が酵素阻害剤である特許請求の範囲第22項又は第25項の方法。

25) 受容体が抗体である特許請求の範囲第22ないし24項のいずれかの1つの方法。

26) 阻害剤が酵素ジヒドロホレート レダクターゼの阻害剤である特許請求の範囲第22ないし25項のいずれか1つの方法。

27) 阻害剤がメソトレキサートであり、かつ酵素がジヒドロホレート レダクターゼである特許請求の範囲第22ないし26項のいずれか1つの方法。

28) 免疫学的に活性な物質がハプテンである特許請求の範囲第22ないし27項のいずれか1つの方法。

29) ハプテンがジゴキシンであり、かつ受容体がジゴキシンに対する抗体である特許請求の範囲第28項の方法。

30) ハプテンがモルヒネであり、かつ受容体がモルヒネに対する抗体である特許請求の範囲第28項の方法。

薬を製造する方法。

20) カップリング剤がカルボジイミドである特許請求の範囲第19項の方法。

21) カップリング剤が1-ブチルクロルホルメートである特許請求の範囲第19項の方法。

22) 試料を、免疫学的に活性な物質と特異的に結合しうる受容体、酵素活性の程度もしくは様式を修飾しうる物質で標識した免疫学的に活性な物質、および酵素ならびに酵素基質と接触させ、かつ得られた酵素活性の程度もしくは様式を測定して標準品で得られたそれと比較する試料中の免疫学的に活性な物質の測定方法。

23) 試料を、免疫学的に活性な物質と特異的に結合することができ、かつ酵素活性の程度もしくは様式を修飾し得る物質で標識された受容体、不溶形態の免疫学的に活性な物質、および酵素ならびに酵素基質と接触させ、かつ固体相を分離後酵素活性の程度もしくは様式を測定して標準品で得られたそれと比較する試料中の免疫学的に活性な物質の測定方法。

31) 免疫学的に活性な物質が蛋白質である特許請求の範囲第22ないし27項のいずれか1つの方法。

32) 蛋白質が人血清アルブミンであり、かつ受容体が人血清アルブミンに対する抗体である特許請求の範囲第31項の方法。

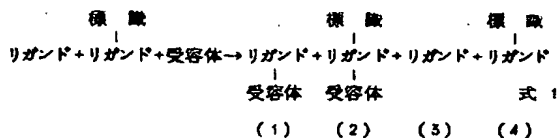
5. 発明の詳細な説明

本発明は免疫学的に活性な物質の測定用新規試験および前記試験を用いる免疫学的方法に関する。

この数年のうちに競争的蛋白質結合分析（飽和分析とも呼ばれる）に基づく多くの分析法が発達した。

同義である「飽和分析」および「競争的蛋白質結合分析」という用語は、免疫学的に活性な物質（リガンド（ligand））の測定に用いられる分析法を指す。生物学的流体中でのこれら測定の結果は、医学的および獣医学的診断に用いられる。診断は測定される物質のレベルが正常であるか又は病的であるかによる。分析原理は、たとえば次式に例示した如く共通の特異的結合剤（受容体）に

対するリガンドおよび標識リガンド間の競合に基づく。



最初の反応は1分子のリガンドが1分子の受容体と結合してリガンド/受容体の2分子複合物 (complex) (1)をつくる反応である。二番目の反応は、同様に受容体と結合する標識リガンドを添加することにより惹起する標識リガンド/受容体複合物(2)を形成する反応である。飽和分析では受容体の濃度および標識リガンドの濃度は一定である。受容体の濃度は標識リガンドが受容体に比較して過剰であるように限定する。これらの条件下でリガンドを添加すると、受容体との競合に対してリガンドおよび標識リガンド間の競合が生じる。それゆえリガンド濃度を高めると、標識リガンド/受容体複合物の量を低下させる。この検

のいずれを用いるかによつて分類される。

放射性検定は非-放射性検定よりも広範囲に利用されている。放射性検定は、検定に用いられる受容体の型により放射性免疫検定又は放射性-受容体検定としてさらに分類されうる。放射性免疫検定では、リガンドおよび標識リガンドと特異的に結合する抗体が用いられる。一方放射性-受容体分析では、リガンドおよび標識リガンドと同様に特異結合するいずれか他の型の生物学的受容体が用いられる。

すべての放射性検定技法におき、反応混合物の未結合分画(式1の3および4)から結合分画(式1の1および2)を物理学的に分離することは欠くことができない。リガンドの濃度の指標(index)は次に、これらの分画を放射能計数管にて計測し、そしてこの未知被検物で得られた計測を同じ検定に付する適当な標準リガンド試料で得られた計測と比較することにより得られうる。ゲルろ過、吸着およびイオン交換クロマトグラフィー、分別沈殿、固相又は電気泳動を含む技法を

特附昭53-115314(3)
定の原理は、受容体に結合している総標識リガンドの百分率測定に基づく。この百分率は測定される被検物(specimen)からの又はこの検定で用いられる標準からの反応混合物に添加されるリガンドの量に反比例する。反応混合物中の標識リガンド/受容体複合物の濃度の減少又は標識リガンドの濃度の増加は、リガンドの濃度の測定に用いられうる。

飽和分析の感度は、リガンドおよび標識リガンドに対して非常に高い選和性を有する受容体の使用に依る。次に、この感度はまた非常に低濃度でも検出されうる標識を用いることに依る。

飽和分析の特異性は、種々の分子の複合混合物中にてリガンドおよび標識リガンドと独占的に結合する受容体能力に依る。

飽和分析は多くの異つた技法を用いて行われるが、その相違は主に用いた標識の型に関係している。一般的にこれらの技法は、標識として放射性トレーサーを用いるか否かによつて分けられる広い意味の「放射性検定」又は「非-放射性検定」

利用して放射性反応混合物の結合分画および遊離分画を分離する多くの異つた種々の方法が記述されてきた。

飽和分析における放射性検定法の発達に伴い、非-放射性標識を用いる方法が発達した。標識として酵素を利用する方法が実証されている。これらの方法は検定過程で標識リガンドの結合(1+2)分画と遊離(3+4)分画との物理的分離が不必要であるという利点を有する。

抗体が酵素で標識されたリガンドと結合すると酵素活性が変化する。酵素活性の変化の程度は、結合分画中の標識リガンド濃度を示し、それゆえ反応混合物中のリガンド濃度の指標となる。

リガンド-酵素複合物の化学構造を決定することは著しく困難であり、これが酵素免疫検定の大きな障害となつている。これは明らかにリガンドと結合する酵素表面にあるアミノ酸側鎖の大きな多様性に帰因する。このことは複合物の種々の調製におけるリガンド-酵素の再生産において非常に困難をもたらす。複合体形成反応の制御が一般

的に欠除すると、多くのリガンド分子が1つの酵素分子へ付いてしまう。抗体とこれらリガンド分子のわずかに二、三の結合が酵素活性の阻害をともなうようなこともある。それゆえすべての抗体／標識抗原相互作用が酵素活性の変化をもたらすとは限らず、これにより技法の感度が低下する。

異なった抗体分子と抗体および酵素分子間の蛋白質-蛋白質相互作用は、酵素表面上のリガンド分子の多様性のもう1つの結果である。蛋白質-蛋白質相互作用は、もしもリガンドもまたポリペプチドであるならばさらに増大される。それゆえこの酵素分子は高い蛋白質濃度の局在的微小環境を導く。このような状態のもとでは蛋白質の沈殿が起ることが立証されており、それによつて結合抗体と遊離分面との分離を必要とすることになり、酵素免疫検定の主要な利点の1つを失うことになる。

リガンドを低分子量の検出分子 (detector molecule) で標識するという点においてこれらの問題を部分的に克服する酵素免疫検定の変法が

式を修飾しうる物質で標識した免疫学的に活性な物質又は前記免疫学的に活性な物質と特異的に結合しうる受容体からなる免疫学的に活性な物質の測定用試薬に関する。

さらに本発明は試料を免疫学的に活性な物質と特異的に結合しうる受容体、酵素活性を修飾しうる物質で標識した免疫学的に活性な物質、酵素および酵素基質と接触させ、かつ得られた酵素活性の程度又は様式を測定して標準品で得られたそれと比較する試料中の免疫学的に活性な物質の測定方法に関する。

さらに本発明は試料を免疫学的に活性な物質と特異的に結合することができ、かつ酵素活性を修飾しうる物質で標識された受容体、不溶形態の免疫学的に活性な物質、および酵素ならびに酵素基質と接触させ、かつ固体相を分離後酵素活性の程度又は様式を測定して標準品で得られたそれと比較する試料中の免疫学的に活性な物質の測定方法に関する。

本明細 中の「免疫学的に活性な物質」又は

特開昭53-115814(4)
記載されている。この検定法では、標識リガンドの抗体結合は検出分子に特異な別の抗体による検出分子の結合を立体的に妨 する。この妨害の程度は、遊離リガンド-検出分子および検出分子標識酵素の、検出分子-抗体との結合に対する競合によつて決定される。酵素活性の変化の程度は、一般的な酵素免疫検定にて測定する如く、反応混合物中のリガンド濃度を同様に示す遊離リガンド-検出分子の濃度を示す。この技法の利点は酵素よりも小さな分子がリガンドに付くことであり、これによつて標識リガンドの化学構造を決定し、かくして前記酵素免疫検定の多くの不利点を克服しうることである。しかしながらこの方法は単にリガンドおよび標識リガンドを含む最初の結合反応の不利点を克服してこれを標識リガンドの結合抗体および抗体遊離分面の程度を測定する検出系へ移すだけである。

従来技術の欠点は標識として酵素修飾物質を用いる本発明によつて克服される。

より詳細には本発明は、酵素活性の程度又は様

「リガンド」という用語は、例えば飽和分析法を用いて、免疫学的に測定され得るいかなる免疫学的に活性な物質又はその一部を指す。必須要件はリガンドと特異的に結合する受容体が存在することである。受容体が抗体である時にはリガンドは特異抗体を形成しうるハプテン又は抗原である。リガンドは抗原性を有する化合物に付いた場合のみ抗体形成を誘発する時にはハプテンを指し、化学的な修飾なしに抗体形成を誘発する時にはリガンドは抗原を指す。リガンドの分子量はおよそ100-1,000,000の範囲の広い値をとりうる。この分子量範囲は、リガンドと特異的に結合する受容体が得られるものであるならば本検定にて限定されるものではない。

リガンドは構造上重合体か又は非-重合体かのいずれかであり得る。重合体である時にはリガンドは通常超原としては生物学的であり、核酸多糖類および(又は)ポリペプチドとして分類される。別に、リガンドが非-重合体である時には、それは通常2,000以下の分子量を有し、かつ広範囲

にわたる 造、機能および生理学的特性を有し得る。

本発明で用いられ得る特に重要なリガンドはアミン、アミノ酸、ペプチド、蛋白質、脂防蛋白質、糖蛋白質、ステロール、ステロイド、リポイド、核酸、モノ-および多糖類、アルカロイド、ビタミン、医薬品、麻酔剤、抗生物質、代謝物質、防疫剤、毒薬、工業用夾雑物(industrial pollutants)、芳香剤、ホルモン、酵素、補酵素、細胞もしくは細胞外組織成分および人もしくは動物から単離した抗体である。しかしながら本検定法はこれらのリガンドのみに限定されるものではない。

この系での分析に直接用いられうる可能性を有する成分は、肝炎 B - 表面抗原；フェリチン(ferritin)；OEA のような腫瘍抗原； α -胎児(feto)蛋白質；リウマチ様因子(rheumatoid factor)；C - 反応性蛋白質；免疫グロブリン IgG、IgM もしくは IgA；ミオグロビン；T₃ および T₄ を含む甲状腺ホルモン、インシュリン；テストステロンもしくはエストロジオールを含む

リガンド又は受容体へ修飾剤が付加すると、分子間結合の形成をもたらす、これは必ずしもではないが大部分の場合は共有性結合である。ある場合にはこの付加は、カップリング剤の存在下に標識とリガンドもしくは受容体との間に連結基を挿入することによつて行われうる。

修飾剤分子は直接にリガンド又は受容体分子へ付加する。しかしながらこの特異的検定法による修飾剤分子とリガンド又は受容体分子間に種々の長さをもつ化学橋を挿入することは好ましい。ある場合には修飾剤分子およびリガンド又は受容体分子を別々に同じ担体分子たとえばポリペプチド又は多糖類の如き高分子に付けることは有利である。

この明細書で用いられる「受容体」という用語は、リガンドおよび標識リガンド又はその一部と特異的に結合しうるいずれかの物質を指す。一般に本検定で用いられる受容体は、適当なヘプテン又は抗原を注射後に脊椎動物の血液中に形成されるリガンドに特異的な抗体である。別に通常みら

特開昭53-115214(5)
ステロイドホルモン；モルヒネの如き麻酔鎮痛剤を含むアビュース(abuse)医薬品；パルピタール酸塩；アンフェタミンの如き刺激剤；ジフェニルヒダントインおよびフェノパルピタールを含むてんかん治療剤；ジゴキシン等の如き強心配糖体；ビタミン B₁₂ の如きビタミン；および薬酸である。さらにこの系での分析において直接の可能性を有する抗体は、梅毒、肺炎、ブルセラ症、風疹およびリウマチに関連した抗体である。

この明細書中の「標識免疫学的活性物質」又は「標識受容体」という用語は、酵素修飾剤で標識されたりガンド、リガンド類似体もしくはその一部又は受容体を指す。1分子、1分子以上、および通常は100分子以下の標識がリガンド又は受容体分子に付加せられる。同様に1、1以上、および通常は5以下のリガンド又は受容体分子が標識分子に付加せられる。リガンド又は受容体分子へ過剰の標識分子が付加すると、通常もしも過剰の標識が結合に影響を及ぼさなければ本検定の感度は増大する。

れる受容体もまた本検定法で使用せられる。この後者の群には蛋白質、核酸および細胞膜が含まれるが、これに限定されるものではない。このような受容体はサイロキシン、インシュリン、アンジオテンシンおよび種々のステロイドホルモンに対する放射性検定法において用いられてきた。

リガンドが抗体である場合には、受容体は宿主動物内にて前記抗体を誘導するのに用いられる抗原であり得る。別の態様では受容体は被測定抗体に対する抗体であり得る。

標識リガンドの結合の際に酵素および修飾剤間の相互作用を減じる受容体作用の型をはつきりと確認することは出来ない。最も妥当な説明は、修飾剤に対する酵素の親和性が受容体/リガンド-修飾剤複合物の大きさおよび実効電荷にかける変化の結果として、リガンド-修飾剤単体のそれに比較して減少するということである。

この明細書で用いられる「修飾剤」という用語は、酵素活性の程度又は様式を修飾するような酵素と相互作用し得るいかなる物質をも指す。この

筋は酵素活性におけるもしくは活性の型における変化たとえば補助因子の要求もしくは最適pHの如き反応条件における、動力学的性状における、又は活性化エネルギーにおける変化によつて直接的に又は間接的に検出しうる酵素の阻害、活性化又は特異性もしくはいずれか他の特性の変化をもたらす。

修飾剤は低分子から高分子までの大きさをとることができ、またその酵素分子との相互作用は分子間会合 (association) がイオン性であるか共有性であるかにより、可逆的もしくは不可逆的のいずれかであり得る。

本検定の感度はとりわけ、リガンドに対する受容体の親和性および酵素活性の程度もしくは様式における変化を生じさせる修飾剤能力にかかっている。酵素活性の程度もしくは様式の修飾は、最小濃度の修飾剤で行われるのが好ましい。分子面上の酵素濃度がこの濃度に近ければ近いほど、検定感度はより大となる。

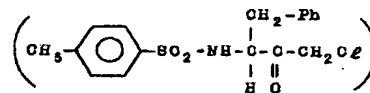
修飾剤は酵素との相互作用においてその活性を

特開753-115814(6)

阻害する酵素阻害剤であるのが好ましい。阻害剤の作用機作は拮抗的、非拮抗的 (non-competitive)、不拮抗的 (uncompetitive)、アロステロイック (allosteric) 又はこれらの様式の2つもしくはそれ以上の組み合わせであり得る。阻害剤は行われる効力検定により 10^{-3} モル/l 以下の阻害定数 (酵素系の50%阻害に必要な阻害剤濃度) を有するのが好ましい。最も好ましい阻害定数は 10^{-15} と 10^{-5} との間である。

本検定では上記方法にて酵素活性を特異的に修飾する修飾剤が存在するならば、いかなる酵素でも使用され得る。選択される酵素は安定で、低コストで容易に入手出来、かつ高いターンオーバー数と簡単に実行される分析系を有する。ターンオーバー数 (1分間に酵素分子当り生成される生成物の分子) は行われる特異試験により100以上であるのが好ましい。ターンオーバー数は出来る限り高く、かつ少なくとも200であるのが最も好ましい。

特に本発明に適した酵素修飾剤系はジヒドロホレートレダクターゼ/メソトレキセート、ジヒドロホレートレダクターゼ/4-アミノ-プテリン、ジヒドロホレートレダクターゼ/この酵素の他の特異的阻害剤; β -グルコニダーゼ/4-デオキシ-5-アミノグルコ糖およびその誘導体; ビオチン含有酵素/アビジン-カルボキシルーゼ/アビジン; キモトリプシン/TPCK



γ -システチオナーゼ/プロパルギルグリシン;
アラニンラセマーゼ/トリフルオルアラニン; ト
リプトファンナーゼ/トリフルオルアラニン; トリ
プトファンシンセターゼ/トリフルオルアラニン;
 β -システチオナーゼ/トリフルオルアラニン;
ピルベート-グルタメートトランスアミナーゼ/
トリフルオルアラニン; 乳酸オキシダーゼ/2-
ヒドロキシ-3-ブチノイック酸 (butynoic acid);
モノアミノオキシダーゼ/N, N-ジ
メチルプロパルギルアミン; およびジアミノオキ
シダーゼ/ $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ である。

酵素活性の測定は比色定量、分光測光法、無光
分光測光ガス測定法、温度測定法 (加熱生成
(heat production))、シンチレーション計数法
を用いて、適当なpHおよび温度下に基質の消費又
は生成物の生成を、直接又は間接に調べることに

よつて行われ得る。

本法の感度を増大させるためには生物発光および酵素法、たとえば J. Lee 等、液体シンチレーション計数法：最近の発達、Stanley P.B. および Boogins, B.A., アカデミックス出版、ニューヨーク P 403 ならびに Lowry O.H. 等, J. Biol. Chem. 236, P. 2746-2755 に記載された方法を用いることができる。

本発明の1つの態様で標識リガンドは、標識リガンドおよび未知被検物を同時に、又は引続いて、適当を出して、リガンドおよび標識リガンドに特異的な受容体を含有する水性希釈へ添加することにより、未知被検物中のリガンドの存在を測定するのに用いられうる。適当な期間インキュベーションした後で、リガンドおよび標識リガンドに結合した受容体分布を、酵素および加えを添加することによつて測定する。リガンドに特異的な受容体はさらに標識リガンドとも結合し、これによつて酵素活性の修飾をこのように減じる酵素と修飾剤との間の相互作用を減少させることができる。本

法および電気泳動を含む放射線免疫検定として記載される多くの技法のいずれかを用いて行われうる。

この検定法はもちろんリガンドとしてハプテンおよび抗原の測定に限定されるものでなく、リガンドとして抗体の固定および測定にも適用される。

これはたとえば抗体を酵素修飾剤で標識し、かつ標識抗体と被検物抗体とを限定量の抗原又はハプテンと一緒にインキュベーションしてから酵素活性変化の程度を測定することによつて行われる。酵素活性の変化は被検物抗体濃度に関連している。必要ならば結合および遊離分面を酵素および加えを添加する前に分離してもよい。

本発明はさらにリガンドの測定に対し標識リガンドの使用よりもむしろ標識受容体の使用を可能にする。未知被検物中のリガンドは酵素修飾剤で標識された過剰の受容体と反応し、かつインキュベーション後は過剰の固相不溶性リガンドが添加され、残存する遊離標識受容体と反応する。固相を分離後に可溶性リガンドに関連する酵素活性の

特開昭53-115814(7)

検定へのリガンドの添加は、受容体との結合に対する標識リガンドとの割合をもたらし、これによつて本検定における遊離標識リガンドの濃度は増大する。リガンド-修飾剤および酵素間の相互作用は増大し、かつ酵素活性はさらに影響を受ける。それゆゑ酵素活性の変化は本検定におけるリガンド濃度の関数 (function) であり、またこれは未結合標識リガンドに帰因する。従つてこの得られた酵素活性とリガンドの不在下に得られたそれとの間の差は、未知被検物中のリガンド濃度を表わす。

本法の大きな利点の1つは、工程中結合分面および遊離分面の分離が必要ないということである。しかしながらこの事は、リガンドならびに標識リガンドの受容体とのインキュベーション後、また酵素活性の定量に先立つて行う本検定での分離工程を妨げるものではない。分面での分離はある場合には、酵素検定を妨げうる被検物中の物質を除去するのが望ましい。分離はゲルろ過、吸着およびイオン交換クロマトグラフィー、分別沈殿、固

相を測定するが、これはリガンド濃度を指す。

本発明の試験はさらにリガンドが少くとも2つの結合面を有していれば「サンドイッチ (sandwich)」法にも用いられうる。リガンドは過剰の固相受容体と反応し、かつインキュベーション後に洗浄され、固相受容体結合リガンドは酵素修飾剤で標識された過剰の受容体と反応させられる。遊離標識受容体を洗浄して除去し、分離分面中の酵素修飾の程度を測定する。その時これがリガンド濃度の指標となる。

次の例は本発明を例証するものである。

例 1

「アミノ-ジゴキシン」の製造

5 ml の無水エタノール中の 156 mg (0.2 ミリモル) のジゴキシン懸濁液へ、10 ml の 0.2 M ナトリウムメタパーイオザートを攪拌しながら添加する。混合物は 10 分後には均一となり、次いでゆつくりと沈殿を生ずる。2 時間後に 5 ml 水 + 5 ml エタノールを添加する。122 ml (2.2 ミリモル) のエチレングリコールをさらに 30 分後に

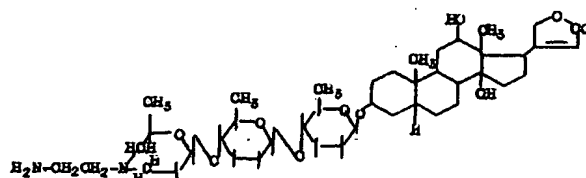
添加すると濃厚な白色沈殿がすぐに生じ始める。
8.0 分間撹拌後、1.35 ml (2.0 ミリモル) のエチレンジアミンを添加し、得られた pH 11.0 を 0.1 M HCl で pH 9.5 に調整し、反応混合物を室温にて 1.8 時間放置する。pH はこの時間内に変化することはない。

1.51.4 mg (4.0 ミリモル) の水酸化ナトリウムを次に添加し、混合物を 5 分間撹拌する。次いで pH を 1 M 酢酸 (約 3 ml) にて 10.5 ないし 6.5 に調整する。この混合物の TLC は Rf 0.15 の単一の大きなスポットを呈する (シリカ-フルミニウム、ブタノール:酢酸:水 / 4:1:1 で展開)。ジゴキシンは、同系にて展開すると Rf 0.7 を有する。

溶液を 60° の水浴を用いて減圧下に回転蒸留器で蒸発させ、ほぼ乾燥させる。残渣のわずかな量の水を 9.5 ml エタノール (5 × 2.0 ml) を添加して除去し、上記の如く蒸発をくり返す。

得られた薄黄色固体を無水エタノールで 5 回抽出し、これらの合併抽出物をおよそ 4 度まで濃縮

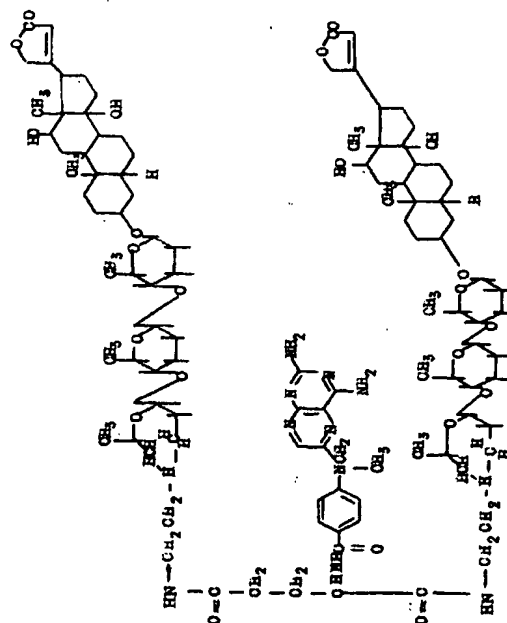
し、かつ遠心分離して分離し、これを少量の塩を調製する。薄黄色の上澄液を乾燥無水気流下に蒸発させて乾燥させ、上記反応混合物と同じ TLC 上の Rf を呈する黄色細状物を得る。この生成物は「フルラム (Fluram)」(4-フェニルスビロ [フルラン-2(3H), 1'-フルラン]-8, 8'-ジオン) と反応して強力に蛍光を発する化合物を生ずることから遊離アミノ基を含有することがわかる。本生成物は無酸中にて 8.85 および 4.95 mμ に吸収ピークを有するジゴキシンのスペクトルと同じスペクトルを示す。さらに本生成物はジゴキシンに特異的な抗血清 (豚兎) に対して強力な凝和力を示す。単離生成物の最もありうべき構造は次の如き構造である。



例 2

メントレキセート-アミノジゴキシン抱合体 (conjugate) の製造

1.1 mg のメントレキセートを 5 ml H₂O 中に溶解させ、pH を 6.5 に調整する。1.0 mg の「アミノジゴキシン」をこの溶液中に溶解させ、溶液を H₂O で 2.0 ml とする。pH を再び 6.5 に調整し、5 ml H₂O に溶解させた 4.84 mg の N-エチル-N'- (3-ジメチルアミノ) プロピル-カルボジイミド塩酸塩を反応混合物に添加する。pH を 2.4 時間経過して 6.2 に保持する。この抱合体を析出として 3 ml クエン酸アンモニウムを用いるシリカゲルカラムで精製する。目的生成物を含有する分画を合併する。この分画はジゴキシンに対して特異的な抗血清 (豚兎) と強力に結合し、さらに酵素ジヒドロホレートレダクターゼ (にわとりの肝臓) を強力に阻害するという二重の能力を有することが判明した。メントレキセート-アミノジゴキシン抱合体の最もありうべき構造は次の如き構造である。



例 5

ジゴキシンに対する酵素阻害剤免疫検定

100 μ l の血清を 50℃ にて 15 分間 100 μ l 抗ジゴキシン抗体溶液、100 μ l NADPH 溶液、100 μ l 2-メルカプトエタノール溶液および 550 μ l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) と一緒にインキュベートする。例 2 の 10.0 μ l のメソトレキセート-ジゴキシン抱合体 (70 μ g/ml) を添加し、混合物を 15 分間インキュベートし、その後 100 μ l のジヒドロホレートレダクターゼ溶液を添加する。用いたジヒドロホレートレダクターゼ調製品はにわたりの肝臓から Kaufman, B.T., および Gardiner, R.C., Journal of Biological Chemistry, 第 211 巻、1519 頁 (1966), の方法によつて単離された。混合物をさらに 5 分間インキュベートし、酵素活性を 100 μ l ジヒドロホレート溶液を添加して測定し、かつ 540 nm にて複数の記録分光光度計により調べる。結果を第 I 表に示す。

4.1 μ g の N, N-ジシクロヘキシルカルボジイミドを溶解させ、本混合物を室温に 15 時間保持する。不溶性尿素副産物をろ過して除去し、100 μ l のろ液を 800 μ l の 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) + 100 μ l ジゴキシン中の 5 μ g の人血清アルブミン溶液へ添加する。この反応混合物を室温にて 50 分間保持し、次に 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) で平衡させたセファデックス G 25 カラムにかける。このカラムをこの緩衝液で洗脱するとメソトレキセートを含有する 2 つの洗出ピークが得られ、その最初がメソトレキセート-人血清アルブミン抱合体を含有する。

例 5

人血清アルブミンに対する酵素阻害剤免疫検定法

10 μ l の新鮮血清を 50℃ にて 15 分間 100 μ l の抗人血清アルブミン抗体 (家兎) 溶液、100 μ l の NADPH 溶液、100 μ l の 2-メルカプトエタノール溶液および 550 μ l のリン酸

第 I 表

反 応 体				酵 素 活 性	
ジゴキシン (試料濃度)	抗ジゴキ シン 抗体	メソトレキセート- ジゴキシン抱合 体(検定における)	酵素 検定 成分	OD/分	阻害%
0	無	0	有	0.150	0
0	無	7 μ g	有	0.100	33
0	有	7 μ g	有	0.145	5
5 μ g/ml	有	7 μ g	有	0.125	16
10 μ g/ml	有	7 μ g	有	0.115	23

反応体は上記順序にて添加される。

OD = 光学密度

上記の結果から血清中の数 μ g のジゴキシンでも上記表においては測定され得ることがわかる。

例 4

メソトレキセート-人血清アルブミン抱合体の製造

4.5 μ g メソトレキセートを 1.0 ml N, N-ジメチルホルムアミド中に溶解させ、かつ 2.5 μ g の N-ヒドロキシスクシンイミドを添加する。

-ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) と一緒にインキュベートする。100 μ l のメソトレキセート-人血清アルブミン抱合体 (8 μ g/ml) を添加し、混合物を 15 分間インキュベートし、その後 100 μ l のジヒドロホレートレダクターゼ溶液を添加する。この混合物をさらに 5 分間インキュベートし、酵素活性を 100 μ l のジヒドロホレート溶液の添加によつて測定し、かつバリアン (varian) 記録分光光度計を用いて 540 nm にて調べる。結果を第 II 表に示す。

第 II 表

反 応 体				酵 素 活 性	
人血清アル ブミン (試料濃度)	抗人血清 アルブ ミン 抗体	メソトレキセート-人 血清アルブミン抱合 体(検定における)	酵素 検定 成分	OD/分	阻害%
0	無	0	有	0.125	0
0	無	0.8 μ g	有	0.068	45
0	有	0.8 μ g	有	0.105	16
5 μ g/ml	有	0.8 μ g	有	0.092	25
10 μ g/ml	有	0.8 μ g	有	0.085	31

上記結果から該 α の人血清アルブミンでさえ上記系においては測定されることがわかる。

例 6

メソトレキセート-アミノエチルモルヒネ複合体の合成

a) O^5 -アミノエチルモルヒネの合成

水素化アルミニウムリチウム (LAH) から新たに蒸留した 10 ml のテトラヒドロフラン (THF) 中へ、400 mg の LAH を陰極下に溶解させる。4 ml の新たに蒸留した THF 中に 400 mg のモルヒネおよび 400 mg のクロルアセトニトリルを含む溶液を 5 分間にわたり添加し、続いて 1 時間蒸流する。混合物を冷却し、0.6 ml の水を加え、次に 0.6 ml の 10 重量 % の水酸化ナトリウムおよび 2 ml の水を加える。混合物をろ過後、この塩を THF で洗滌し、THF 分画を合併し、陰極下に無水マグネシウムで乾燥させ、ろ過し、かつろ液を蒸発させて 380 mg の O^5 -アミノエチルモルヒネを得る。

b) N-ε-プトロキシルカルボキシル-γ-(O^5 -

製造)を室温で攪拌し、かつトリフルオル酢酸 (1 ml) を添加する。混合物を 15 分間攪拌してから蒸発、乾燥させる。残留物は無色ガラス状物 (40 mg) である。

4) メソトレキセート-γ-(O^5 -アミドエチルモルヒネ)-α-ベンジルエステルの合成

5 ml のジメチルスルホキシド (DMSO) 中の 4-アミノ-4-デオキシ-N¹⁰-メチルプテロイン酸 (methylpteroic acid) (37 mg) の溶液を攪拌しながら室温にて、トリエチルアミン (28 μl) および 1-ブチルクロルホルメート (25 μl) で処理し、本混合物を 30 分間攪拌する。次にこれを DMSO (2 ml) 中のモルヒネ誘導体 (上記 0 の如く製造した 75 mg) およびトリエチルアミン (28 μl) の混合物へ添加し、この混合物を 60°C にて 1 時間攪拌する。冷却混合物を水で希釈し、酢酸エチルで 2 回抽出する。合併酢酸エチル抽出物を水洗し、次に 0.1 N 塩酸で 2 回抽出する。合併酸性抽出物を十分な量の 10 重量 % 水酸化ナトリウムで処理して pH を 8.0 まで上

-アミノエチル-モルヒネ)グルタミン酸-α-ベンジルエステルの合成

ジクロルメタン (5 ml) 中の O^5 -アミノエチルモルヒネ (上記の如く製造した 50 mg)、N-ε-Boc-グルタミン酸-α-ベンジルエステル (34 mg) およびジシクロヘキシルカルボジイミド (25 mg) の混合物を室温で 4 時間攪拌する。混合物を酢酸エチルで希釈し、希釈液ナトリウム溶液にて洗浄する。次に酢酸エチル溶液を 0.1 N 塩酸で 2 回抽出し、合併酸性抽出物を十分な量の 10 重量 % 水酸化ナトリウム溶液で処理して pH を 8.0 に調整する。この溶液を酢酸エチルで 2 回抽出し、合併酢酸エチル抽出物をブライン (brine) で洗浄し、乾燥させ (無水酢酸ナトリウム)、かつ蒸発させて無色油状物 (36 mg) を得る。

c) グルタミン酸-γ-(O^5 -アミドエチルモルヒネ)-α-ベンジルエステル-トリフルオル酢酸塩の合成

ジクロルメタン (5 ml) 中の N-ε-Boc-グルタミン酸-モルヒネ誘導体 (36 mg、上記の如

ける。この混合物を酢酸エチルで 3 回抽出し、合併抽出物をブライン洗浄し、乾燥させ (無水酢酸ナトリウム)、かつ蒸発させて黄色油状物 (15 mg) を得る。これをクロロホルム/メタノール、4:1 で展開する調製用シリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて精製する。目的生成物は黄色固体 (4 mg) として得られる。

e) メソトレキセート-γ-(O^5 -アミドエチルモルヒネ)の合成

上記 d の如く製造した生成物 (4 mg) を 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液 (5 ml) と混合し、この混合物を室温にて 8 時間攪拌すると清澄な黄色溶液が得られる。

ここへ 0.1 N 塩酸 (5 ml) を添加し、この混合物をオルトリン酸ナトリウム緩衝液 (0.05 M、pH 7.4) で 25 ml までにすると、調製検定に用いられうる所望化合物の溶液が得られる。

例 7

モルヒネに対する酵素阻害剤免疫検定

10 μl の適当な濃度のモルヒネ溶液、50 μl

解 説

のメソトレキセート-γ-(0⁵-アミドエチルモルヒネ) 溶液 (4 mg / 2.5 ml)、5.0 ml の抗モルヒネ抗体溶液、1.0 ml の NADPH 溶液、1.0 ml の 2-メルカプトエタノール溶液、5.0 ml の塩化カリウム溶液、EDTA 含有の 15.0 ml のトリス-HCl 緩衝液 (pH 7.5) および 1.0 ml のジヒドロホレートレダクターゼ (E. casei) 溶液の混合物を 37°C にて 2.0 分間インキュベートする。混合物中の酵素活性は、1.0 ml のジヒドロホレート溶液を添加後にセントリフュージン (Centrifuge) 遠心分析器を用いて 340.0 nm にて溶液の吸光変化を調べることにより測定される。結果を第 1 表に示す。

反 応 体				酵素活性	
モルヒネ μg/効力 検定	抗モル ヒネ 抗体	モルヒネ-メソ トレキセート 複合体	酵素 検定 成分	OD/分	阻害率
0	無	無	有	0.54	0
0	無	3×10^{-8} M	有	0.14	76
0	有	3×10^{-8} M	有	0.41	29
0.04	有	3×10^{-8} M	有	0.37	36
0.40	有	3×10^{-8} M	有	0.35	40
4.0	有	3×10^{-8} M	有	0.31	46
20	有	3×10^{-8} M	有	0.27	54
40	有	3×10^{-8} M	有	0.25	60

上の表からモルヒネの濃度が増加するにつれて、ジヒドロホレートレダクターゼの活性が減少してゆくことがわかる。このように 4 μg/ml をいし 40 μg/ml のモルヒネを含有するモルヒネ溶液は、わずか 1.0 ml の溶液を入手出来れば分析され得る。しかしこの事は、必要とされる範囲があること

とを誤わそうとするのではなくむしろ首尾よく行われ得るということを誤わそうとしているのである。

例 8

フェリチン-メソトレキセート複合体の合成
リン酸ナトリウム緩衝液 (0.05 M、pH 8.5、5 ml) 中の人肝臓フェリチン (1.5 mg) および 1 ml のジメチルホルムアミド (DMF) の溶液を磁器にて攪拌し、そして DMF (2 ml) 中のメソトレキセート (2.5 mg) をトリエチルアミン (2.1 ml) および 1-ブチルクロルホルメート (1.5 ml) で、室温にて 3.0 分間処理して得られた 1.0 ml の溶液を添加する。混合物を室温にて 2 時間攪拌し、次に 2 × 2 ml のオルトリン酸ナトリウム緩衝液 (0.05 M、pH 7.4、塩化ナトリウム 0.1 M およびナトリウムアジド 0.05 重量%を含有する) で 2.4 時間透析する。次にこの溶液を同じ緩衝液で平衡させたセファデックス G-25 カラムを通し、フェリチン含有分画を合併し、かつ緩衝液で 1.0 ml になるようにする。

得られた溶液はフェリチン測定の酵素免疫検定での使用に適するものである。

代理人 浅 村 路

外 5 名